

ISBN: 978-602-98559-2-0

JILID 1

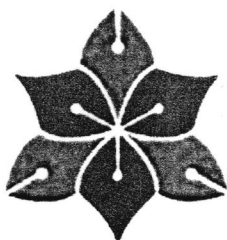
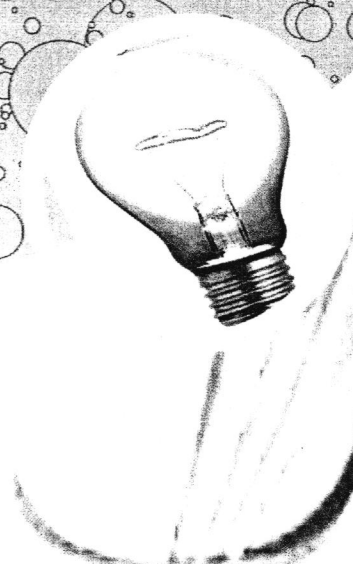
PROSIDING SEMINAR

Bidang Biologi

**SEMINAR DAN RAPAT TAHUNAN
BIDANG ILMU MIPA 2013**

BKS PTN BARAT

Universitas Lampung, 10-12 Mei 2013



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG**

Universitas Lampung, 10-12 Mei 2013

Didukung oleh:



PHENOM

analytical

PROSIDING

SEMINAR DAN RAPAT TAHUNAN

Bidang MIPA BKS PTN Wilayah Barat Tahun 2013
Bandar Lampung, 10 – 12 Mei 2013

ISBN 978-602-98559-2-0

Dewan Penyunting

Warsito
Sutopo Hadi
Tati Suhartati
Simon Sembiring
Mulyono
Muslim Ansori
Mustofa Usman
Kurnia Muludi
Endang Linirin W
Sumardi
Buhani
Suripto Dwi Yuwono
Jani Master
Sugeng Sutiarto
Abdurrahman
Nismah Nukmal

Penyunting Pelaksana

Heri Satria
Kamisah D Pandiangan
Elly Lestari
Febriandi Hasibuan
Rifqi Almusawi R



Diterbitkan oleh FMIPA Universitas lampung
Bandar Lampung

Penyunting: Warsito dkk.
ISBN 978-602-98559-2-0
Cetakan Pertama, Tahun 2013
©copyright FMIPA Unila

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	Halaman i
DAFTAR ISI	ii
COOKIES IKAN GABUS SEBAGAI MAKANAN TAMBAHAN UNTUK IBU HAMIL TRIMESTER II <i>Arfiyanti</i>	1-8
FORTIFIKASI <i>COOKIES</i> DAGING SAPI DENGAN BAHAN MAKANAN SUMBER GIZI UNTUK IBU HAMIL TRIMESTER II <i>Arfiyanti</i>	9-16
POTENSI CEPHALOPODA SEBAGAI BIOMATERIAL BARU <i>Abdul Razak*</i>	17-20
FAKTOR IMUNOMODULATOR KELENJAR SALIVA ANOPHELES SUNDAICUS SEBAGAI TARGET POTENSIAL DALAM PEMBUATAN TRANSMISSION BLOCKING VACCINE (TBV) MELAWAN MALARIA <i>Adrial¹, Zulkarnain Edward¹, Suci Lestari²</i>	21-30
KEANEKARAGAMAN FLORA DAN FAUNA DI KOTA PEKANBARU, RIAU <i>Ahmad Muhammad</i>	31-38
HUBUNGAN ANTARA VALIDITAS BUTIR, RELIABILITAS, TINGKAT KESUKARAN DAN DAYA PEMBEDA SOAL UJIAN SEMESTER GENAP BIDANG STUDI BIOLOGI KELAS XI SMA/MA NEGERI DI KOTA PADANG TAHUN PELAJARAN 2010/2011* <i>Anizam Zein**, Muhyiatul Fadillah**, Rahma Novianti***</i>	39-48
ANALISIS KESINAMBUNGAN MATERI BIOLOGI PADA BUKU SEKOLAH ELEKTRONIK (BSE) JENJANG SD, SMP, DAN SMA. SEBUAH STUDI DESKRIPTIF KUALITATIF. <i>Apriliana Laily Fitri, Bima S.K.A. Sasongko, Eka P. Azrai</i>	49-62
PENGARUH MODEL PEMBELAJARAN ARIAS DENGAN PENDEKATAN CTL TERHADAP HASIL BELAJAR BIOLOGI SISWA KELAS VII SMPN 1 PADANG <i>Ardi^{*)}, Ramadhan Sumarmin^{*)}, Friska Ellen^{**)}</i>	63-70
KEARIFAN LOKAL PENGGUNAAN TUMBUHAN OBAT OLEH SUKU LEMBAK DELAPAN DI KABUPATEN BENGKULU TENGAH, BENGKULU <i>Ariefa Primair Yani / FKIP Universitas Bengkulu</i>	71-74

PENGARUH PEMBERIAN FUNGI MIKORIZA MULTISPORA TERHADAP PRODUKSI TANAMAN JAGUNG (<i>ZEA MAYS</i> L.) <i>Gustina Indriati. ; Liza Irda Ningsih. ; Rizki.</i>	323-328
IMPOTANCE VALUE OF GROUND VEGETATION AT TWO RUBBER PLANTATIONS, INDRALAYA, SOUTH SUMATERA ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED. <i>Hanifa Marisa & Salni</i>	329-332
KONSERVASI INDIGENOUS SPECIES EKOSISTEM HUTAN RAWA GAMBUT RIAU <i>Haris Gunawan¹, Ahmad Muhammad¹, Nurul Qomar²</i>	333-338
SCREENING OF BIOSURFACTANT PRODUCING HYDROCARBONOCLASTIC BACTERIA AS A BIOREMEDIATION AGENT OF PETROLEUM CONTAMINATED ENVIRONMENT <i>Hary Widjajanti, Muharni, dan Mirfat</i>	339-346
CHARACTERIZATION OF VECTOR DNA MICROSATELLITE DENGUE HEMORRAGIC FEVER (DHF) <i>Aedes Aegypti</i> WITH ENRICHMENT METHOD <i>Hasmiwati¹, Djong Hon Tjong² dan Dessy Arisanty³</i>	347-356
PENGUNAAN BIJI ASAM JAWA (<i>Tamarindus indica</i> L.) DAN BIJI KECIPIR (<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> L.) SEBAGAI KOAGULAN ALAMI DALAM PERBAIKAN KUALITAS AIR TANAH <i>Hendrawati¹. Delsy Syamsumarsih¹. Nurhasni¹</i>	357-370
HISTOLOGI ULAS VAGINA DAN WAKTU SIKLUS ESTRUS MASA SUBUR MENCIT BETINA SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK RIMPANG RUMPUT TEKI <i>Drs. Hendri Busman, M.Biomed</i>	371-376
HIBRID F ₁ KACANG HIJAU (<i>Vigna radiata</i> L.) HASIL PERSILANGAN VARIETAS KENARI X KULTIVAR LOKAL KAMPAR <i>¹Herman, ¹Dewi Indriyani Roslim dan ²Zulkifli</i>	377-380
KOMUNITAS BULU BABI (ECHONOIDEA) DI PULAU CINGKUAK, PULAU SIKUAI DAN PULAU SETAN SUMATERA BARAT <i>Indra Junaidi Zakaria</i>	381-388
DESAIN DAN PENGAYAAN KANDANG DALAM UPAYA KONSERVASI EX-SITU <i>Tarsius bancanus saltator</i> DI GUNUNG TAJAM, PULAU BELITUNG <i>Indra Yustian & Nadya B. Silva Lestari</i>	389-398

Characterization of vector DNA microsatellite Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) *Aedes aegypti* with Enrichment Method

Hasmiwati¹, Djong Hon Tjong² dan Dessy Arisanty³

¹ Parasitology Devision, medical Faculty, Andalas University, Padang
Email: hasmiwati65@gmail.com

² Biology Departement, Mathematic and Science Faculty,
Andalas University, Padang

³ Biochemestry Devision, medical Faculty, Andalas University, Padang

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi DNA mikrosatelit dari nyamuk *Aedes aegypti* dengan metode Enrichment (Pengayaan). DNA diisolasi dan selanjutnya dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi secara simultan menggunakan enzim Alu I, RsaI dan Hinc II. Selanjutnya diligasi dengan adaptor MluI (terdiri dari 21 - mer : 5' CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA3' dan phosporilated 25-mer pada ujung 5': 3'ACA CGA GAA CGA A TG GCA CCT GATp 5'). Sebanyak 6 oligonukleotida bermotif mikrosatelit (AT)₂₀, (CT)₂₀, (GT)₂₀, (AC)₂₀, (AG)₂₀ dan (GC)₂₀ di hibridisasi menggunakan membran Hybon. Fragmen hasil hibridisasi di elusi dan diamplifikasi (PCR) dengan menggunakan primer 21- mer. Hasil penelitian ini menunjukkan produk amplifikasi dari DNA elusi didapatkan fragmen berukuran 700 bp, 610 bp, 550 bp, 490 bp dan 450 bp yang merupakan kandidat fragmen DNA yang mengandung motif mikrosatelit. Dari penelitian ini dapat disimpulkan metode pengayaan (enrichment) dapat menghasilkan kandidat fragmen DNA mikrosatelit *Aedes aegypti* vektor DBD di Sumatera Barat.

Key words: *Aedes aegypti*, Isolasi, Pengayaan, Hibridisasi dan DNA Mikrosatelit

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Demam berdarah Dengue (DBD) merupakan salah satu penyakit yang bermasalah besar di daerah tropik dan subtropik. Populasi nyamuk *Aedes aegypti* yang berasal dari daerah geografi berbeda dapat berbeda dan menunjukkan kapasitas vektorialnya atau kerentanannya terhadap virus dengue juga berbeda.

Pengendalian nyamuk selama ini biasanya dilakukan kalau terjadi epidemik DBD di suatu lokasi dengan fogging menggunakan insektisida. Penggunaan insektisida yang terus menerus akan menyebabkan nyamuk menjadi resisten, jika nyamuk telah resisten maka kemampuan menularkannya semakin tinggi, selain itu dengan terjadinya pemanasan global maka akan berpengaruh

terhadap jumlah populasi nyamuk sehingga kasus DBD selalu terjadi maka salah satu alternative dalam usaha pengendaliannya dapat dilakukan secara genetik.

Usaha pengendalian nyamuk *Aedes aegypti* secara genetik adalah dengan mengetahui diversitasnya. Diversitas genetik meliputi struktur genetik, aliran gen dan differensiasi antar dan inter populasi. Diversitas genetik dapat dipelajari dengan menggunakan beberapa marker seperti allozim, RAPD, RFLP dan DNA mikrosatelit (Lovin, de Bruyn, Hemme, Mori, Epstein, Harker, Streit dan Severson, 2009). DNA Mikrosatelit merupakan salah satu tool (marker/penanda) molekuler yang dikembangkan untuk mempelajari genetika populasi dan diversitas genetik pada serangga dan merupakan salah satu marker yang mempunyai tingkat kepercayaan yang tinggi (Jarne dan Lagoda, 1996). Istilah



mikrosatelit yang sering digunakan oleh para peneliti antara lain : Short Tandem Repeat (STR) (Craig, *et al.* 1988) ; dan Simple Sequences Repeats (SSRs) (Jacob *et.al.* 1991). Mikrosatelit juga merupakan penanda genetik yang sering digunakan untuk mempelajari system perkawinan dan struktur populasi (Steffen *et al.* 1993), pautan (linkage), pemetaan kromosom dan analisa populasi (Silva *et al.*1999)

Penelitian tentang diversitas genetik *Aedes aegypti* berdasarkan DNA mikrosatelit telah dilakukan antara lain oleh Huber, Mousson, Rodhain dan Failloux (1999) yaitu sekuen mikrosatelit sebagai marker dalam studi genetik *Aedes aegypti* sebagai vektor DBD. Ravel, Monteny, Olmos, Verdugo dan Cuny (2001) melakukan studi awal tentang genetika populasi *Aedes aegypti* di Mexico. Lovin, de Bruyn, Hemme, Mori, Epstein, Harker, Streit dan Severson (2009) mengenai pengembangan polimorfik DNA mikrosatelit dan validasi serta study populasi genetika nyamuk *Aedes aegypti* di Haiti. Kemudian Paupy, Brengues, Ndiath, Toty, Herve dan Simard (2010) menggabungkan data morfologi dan DNA mikrosatelit untuk melihat variabilitas morfologi dan genetik *Aedes aegypti* di Niakhar, Senegal.

Penanganan kasus DBD menjadi lebih kompleks di Sumatera Barat karena mobilitas penduduk yang tinggi dan penyebaran vektornya, yang cepat melalui transportasi oleh karena itu perlu perancangan primer penanda (marker) genetik berdasarkan DNA mikrosatelit untuk *Aedes aegypti* di Sumatera Barat penting dilakukan, hal ini akan menjadi dasar dalam pengendalian nyamuk vektor DBD ini terutama terkait dengan kebijakan penyusunan strategi pengendalian vektor. Tujuan Penelitian ini adalah mengkarakterisasi DNA mikrosatelit dengan metode Enrichment (Pengayaan).

METODE PENELITIAN

Cara Kerja

Isolasi DNA nyamuk

DNA nyamuk disolasi menurut prosedur (Hoelzel, 1994) yang telah dimodifikasi oleh Anggraini,1998), yaitu CTAB (Cetyl Trimetyl ammonium Bromide) dipanaskan pada waterbath 60 °C selama 10 menit dan penambahan proteinase K.

Elektroforesis

Hasil isolasi DNA dicek dengan menggunakan gel elektroforesis 1,2 % dalam buffer 0,5 TBE (Sambrook *et al.*, 1989). Kwantitas (Konsentrasi) DNA yang didapat dengan membandingkannya dengan λ DNA, selain itu konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan nano Drop. Setelah itu sampel disimpan pada -20°C sebelum digunakan untuk proses berikutnya.

Restriksi/Pemotongan DNA

Pemotongan DNA genom (sesuai dengan instruksi pemasok enzim) dari DNA genom di potong dengan menggunakan enzim Alu I , Rsa I dan Hind II (Vivantis), secara simultan. diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Hasil pemotongan ketiga enzim restriksi dapat dicek dengan dgn menggunakan Nano drop.

Ligasi dengan adaptor

DNA yang telah dipotong selanjutnya di ligasi dengan 3 μ g adaptor *Mlu*I (terdiri dari 21-mer : 5' CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA3' dan fosforilated 25-mer pada ujung 5': 3'ACA CGA GAA CGA A TG GCA CCT GATp5'). Komposisi ligasi adalah sebagai berikut : DNA 1 μ l, adaptor 21-mer 0,5 μ l, adaptor 25-mer 1 μ l, 5x Rapid ligation buffer 5 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l (Promega-USA) dan nuclease free water hingga total volume 50 μ l, yang diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 malam.



Amplifikasi

Amplifikasi dilakukan menggunakan primer adaptor 21-mer. Siklus temperature PCR yang di gunakan pada penelitian ini adalah denaturasi awal pada suhu 94°C selama 30 detik 1 kali, denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 60°C selama 1menit, polimerisasi pada suhu 72 °C selama 2 menit dengan 35 siklus, polimerisasi akhir 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi di cek dengan elektroforesis pada gel agarose 1,5% dalam 0,5x TBE.

Pengayaan Mikrosatelit

Persiapan Reagen

Oligonukleotida yang digunakan untuk memperkaya DNA mengandung motif mikrosatelit adalah : (AT)_n (CT)_n (GT)_n (AC)_n (AG)_n (GC)_n (Slotman *et al.* 2007), 6 Oligonukleotida dibagi menjadi 3 kelompok membran mengikuti Kusumawaty (1999) berdasarkan melting temperature (T_m) dari masing-masing nukleotida yang diformulasi oleh Sambrook *et.al.* (1989) dengan rumus : $T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 0.41 (\% G+C) - 600/n$.

Untuk tiap kelompok membran, 10 µl dari masing-masing nukleotida dicampur kemudian ditambahkan 5x SSC (Standar Salin Citrate: 75 mM sodium citrate pH 7 dan 750 mM NaCl) hingga total volume 1000 µl. Campuran tersebut ditetaskan diatas membran Hybond N+ berukuran 0,5 cm² (Amersham, Arlington Heigh, IL US). Kemudian membran dikering anginkan selama 1 jam dan difiksatif pada suhu 65°C selama 1 jam, selanjutnya didedahkan pada UV selama 30 detik. Untuk melepaskan oligonukleotida yang terikat lemah pada membran, membran dicuci 2x menggunakan 10 ml buffer hibridisasi (50% formamide, 3x SSC, 25 mM Na-fosfat, pH7 dan 5% SDS) pada suhu 45°C selama 48 jam (ganti buffer hibridisasi 1x 24 jam).

Selanjutnya membran disimpan dalam petri steril pada suhu -20°C hingga saat diperlukan.

Pengayaan/Enrichmen DNA Mikrosatelit

Metode yang digunakan berdasarkan Edward *et.al.* (1996) dan Zane *et.al.* (2002) dengan sedikit modifikasi. Pengayaan mikrosatelit dibagi atas 3 tabung. Setiap tabung berisi berisi 50 µl DNA yang telah terdenaturasi (dimasukan dalam air mendidih selama 10 menit) dalam 500 µl buffer hibridisasi (5x SSC, 25 mM natrium fosfat pH 7, 0,05% SDS), 2 µg 21-mer oligonukleotida dan 1 membran. Pengayaan dilakukan pada 3 tabung (tabung I berisi 1 membran dan buffer hibridisasi tanpa formamide, tabung II, 1 membran dengan buffer hibridisasi dan 25% formamide dan tabung III, 1 membran dengan buffer hiridisasi dengan 50% formamide. Hibridisasi pada suhu 50°C selama 48 jam dengan menggunakan : “Shake ’n Stack oven hibridisasi. DNA yang terikat atau yang terhibridisasi pada oligo yang terikat pada membran dielusi pada suhu 95°C (air mendidih) dan DNA hasil elusi ini disimpan pada -20°C dan selanjutnya diamplifikasi.

Amplifikasi DNA Elusi

DNA hasil elusi diamplifikasi dengan menggunakan primer adaptor 21-mer dengan kondisi PCR : denaturasi awal pada suhu 94°C selama 30 detik 1 kali, denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 60°C selama 1 menit, polimerisasi pada suhu 72 °C selama 2 menit dengan 35 siklus, polimerisasi akhir 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi di cek dengan elektroforesis pada gel agarose 1,5% dalam 0,5x TBE dengan pewarnaan dengan Etidium Bromid 2 µg/100 ml. Fragmen DNA yang teramplifikasi diamati dengan Geldoc selanjutnya didokumentasi.

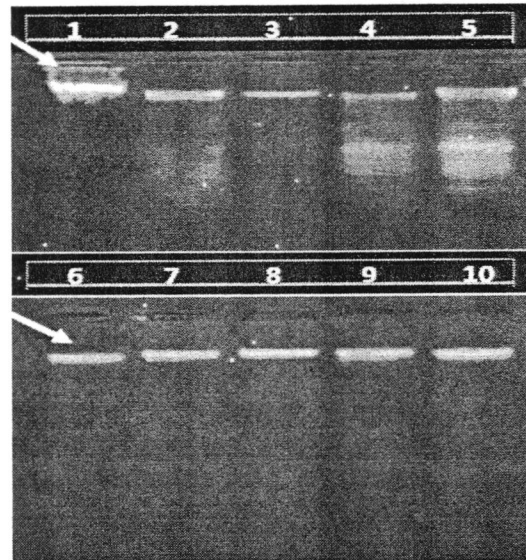


HASIL DAN DISKUSI

Isolasi DNA nyamuk *Aedes aegypti*

Pada penelitian ini DNA nyamuk disolasi menurut prosedur (Hoelzel, 1994) yang telah dimodifikasi oleh Anggraini, 1998). Sebanyak 100 μ l larutan buffer CTAB (Cetyl Trimethyl ammonium Bromide). Hasil isolasi DNA dicek dengan gel elektroforesis 1,5 % dalam buffer 0,5x TBE (Sambrook *et al.*, 1989). Hasil isolasi DNA dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil isolasi ini cukup baik karena tidak kelihatan smear. Untuk mengetahui konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan Nano Drop hasilnya seperti terlihat pada Tabel 1. Konsentrasi yang didapatkan bervariasi antara 3,6 sampai 60,9 $\text{ng}/\mu\text{l}$ dengan kemurnian 1,82 sampai 2,52. Dari hasil ini dipilih beberapa konsentrasi DNA yang tinggi untuk selanjutnya dilakukan restriksi atau pemotongan dengan menggunakan

enzim restriksi, karena untuk restriksi diperlukan konsentrasi DNA yang tinggi.



Gambar 1. Contoh fragmen hasil Isolasi DNA nyamuk *Aedes aegypti*.

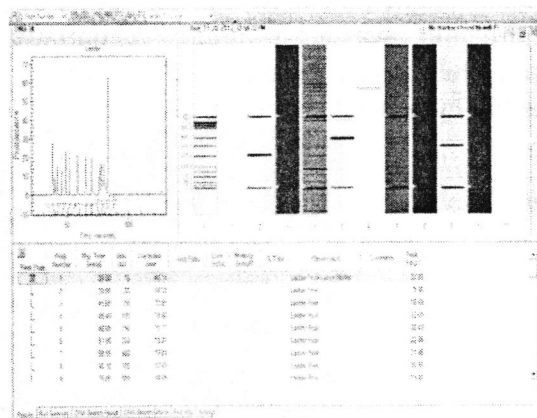
Tabel 1 : Konsentrasi DNA Nyamuk *Aedes aegypti* dengan Nano Drop

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	sample type
blank	0	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0	-0,002	-0,17	-0,03	DNA
5p	26,2	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,525	0,276	1,9	0,64	DNA
1p	60,9	$\text{ng}/\mu\text{l}$	1,219	0,608	2,01	0,7	DNA
s8	16,4	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,328	0,162	2,03	0,56	DNA
blank	0	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0	-0,012	0,01	0,06	DNA
s7	10,7	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,215	0,093	2,3	0,32	DNA
s10	23,6	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,471	0,216	2,18	0,65	DNA
9p	29,7	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,593	0,3	1,98	0,7	DNA
blank	0	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0	-0,012	0,01	0,06	DNA
9s	23,5	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,47	0,213	2,2	0,6	DNA
6s	23,9	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,478	0,226	2,11	0,78	DNA
5s	3,6	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,072	0,029	2,52	0,15	DNA
6p	42,8	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,856	0,387	2,22	0,92	DNA
4p	29	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,58	0,319	1,82	0,85	DNA
4p	48,6	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,973	0,469	2,07	0,98	DNA
4s	50,6	$\text{ng}/\mu\text{l}$	1,012	0,503	2,01	0,96	DNA
3s	14,2	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,284	0,122	2,32	0,74	DNA
blank	0	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,001	-0,006	-0,12	0,14	DNA
3p	22,4	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,448	0,213	2,1	0,82	DNA
2p	27	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,541	0,263	2,06	1,04	DNA
alu	5,5	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,11	0,108	1,02	0,12	DNA
blank	0	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,001	-0,006	-0,12	0,14	DNA
hind3	5,7	$\text{ng}/\mu\text{l}$	0,114	0,027	4,31	0,24	DNA

Restriksi atau Pemotongan DNA genom *Aedes Aegypti*

Restriksi dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi Alu I, RsaI dan Hind II, sesuai dengan yang dilakukan Edwards *et al* (1996) dan Kusumawaty *et al* (2005). Restriksi ini dilakukan secara simultan, hal ini dilakukan untuk menghasilkan fragmen DNA yang pendek berukuran 200 sampai 1500 bp yang bertujuan untuk memudahkan penempelan adaptor saat dilakukan ligasi dengan adaptor. Pemotongan DNA dengan banyak enzim ini menurut Zane *et al* (2002) bahwa restriksi DNA genom dengan banyak enzim akan dapat meningkatkan peluang mendapatkan motif mikrosatelit dan mengurangi fragmen sisipan yang sama.

DNA genom *Aedes aegypti* yang telah dipotong dicek dengan elektroforesis, secara teori dinyatakan bahwa restriksi DNA genom akan menghasilkan fragmen yang smear karena banyaknya fragmen yang terpotong namun pada penelitian ini tidak dapat ditunjukkan hasilnya, hal ini mungkin disebabkan karena konsentrasi DNA hasil restriksi sangat kecil sehingga tidak tervisualisasi melalui gel elektroforesis, untuk ini dilakukan dengan menggunakan Experion 1 kb, hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2 berikut :

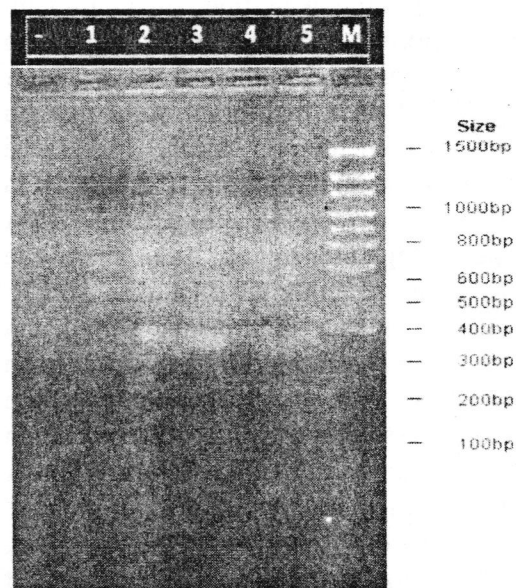


Gambar 2. Hasil Restriksi Genom *Aedes aegypti* yang dicek dengan Experion 1 kb

Hasil restriksi ini selanjutnya dilakukan ligasi dengan adaptor MuI (terdiri dari 21 - mer : 5' CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA3' dan phosphorilated 25-mer pada ujung 5': 3'ACA CGA GAA CGA A TG GCA CCT GATp5').

Ligasi fragmen DNA *Aedes aegypti* dengan adaptor

Pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan kit Ligation (Promega) prosedur yang dilakukan sesuai dengan yang direkomendasikan pabrik dengan menambahkan adaptor MluI. Hasil ligasi selanjutnya dimplifikasi (di PCR) dengan primer 21- mer dan di cek dengan elektroforesis. Hasil PCR ini dapat dilihat pada gambar 3. Hasil ini menunjukkan bahwa terdapatnya fragmen DNA yang berukuran antara 100 sampai 1000 bp sesuai dengan hasil restriksi. Hasil ini akan memberi peluang penempelan mikrosatelit pada saat dilakukan pengayaan.



Gambar 3. Produk PCR hasil Ligasi DNA dengan adaptor MluI.

Ket : M = marker. 1, 2, 3, 4 dan 5 sampel nyamuk *Aedes aegypti*

Fragmen DNA genom nyamuk *Aedes aegypti* hasil ligasi telah menunjukkan hasil sesuai dengan target yaitu fragmen dengan ukuran 100 sampai 1000 bp. Hasil ini menunjukkan hasil yang baik untuk dilanjutkan untuk dihibridisasi dengan motif hibridisasi. Fragmen DNA genom nyamuk *Aedes aegypti* hasil ligasi telah menunjukkan hasil sesuai dengan target yaitu fragmen dengan ukuran 100 sampai 1000 bp. Hasil ini menunjukkan hasil yang baik untuk dilanjutkan untuk dihibridisasi dengan motif mikrosatelit.

Hibridisasi

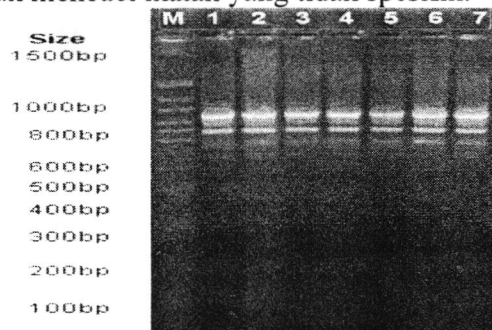
Proses hibridisasi dilakukan dilakukan pengayaan dengan menggunakan 6 macam motif mikrosatelit. Motif yang dipakai adalah : (AT)₂₀, (CT)₂₀, (GT)₂₀, (AC)₂₀, (AG)₂₀ dan (GC)₂₀. Ke enam motif mikrosatelit ini dikelompokkan menjadi 3 membran berdasarkan T_m mengacu pada metode Edwards *et al.* (1996) dan Kusumawaty *et al.* (2005). Hasil pengelompokan ini dapat dilihat pada Tabel 3 berikut :

Tabel 2 : Pengelompokan oligonukleotida (motif mikrosatelit) berdasarkan T_m

Membran I		Membran II		Membran III	
Oligonukleotida	TM (°C)	Oligonukleotida	TM (°C)	Oligonukleotida	TM (°C)
(CT) ₂₀	59,8	(GT) ₂₀	64,3	(AT) ₂₀	34,5
(AG) ₂₀	59,8	(AC) ₂₀	64,3		

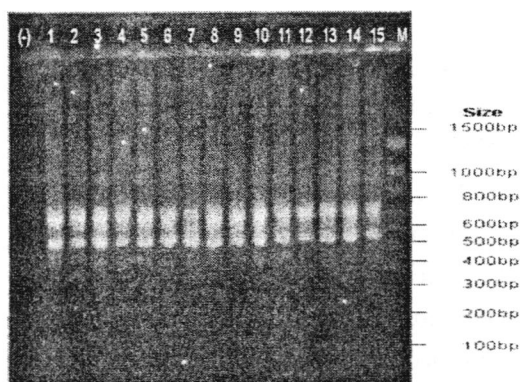
Setelah hibridisasi dilakukan proses elusi (pencucian) dan dilakukan PCR untuk mendapatkan kandidat-kandidat mikrosatelit yang akan diperbanyak melalui proses kloning. Proses elusi dilakukan untuk melepaskan fragmen-fragmen DNA yang terikat pada membran, yaitu dengan merendam membran hasil hibridisasi dengan air mendidih selama 10 menit. Pada kondisi suhu tinggi diharapkan DNA sampel yang menempel pada membran dapat lepas, selanjutnya dilakukan PCR. Hibridisasi adalah merupakan pengikatan antara DNA hasil amplifikasi yang telah terdenaturasi dengan membran nilon hybon (Amersham, USA) yang telah mengandung motif mikrosatelit. Untuk penyiapan membran yang akan digunakan dalam proses hibridisasi motif yang digunakan adalah motif non label radioaktif pemilihan ini dilakukan karena lebih aman dan murah, jika dibandingkan dengan yang radioaktif. Motif yang dilabel radioaktif lebih sensitif tapi kurang aman dalam penggunaannya. Dalam mengusahakan pengikatan yang kuat oligonukleotida (motif) pada membran dilakukan dengan

pendedahan dengan sinar Ultra Violet. Setelah itu dilakukan fiksasi pada oven yang berguna untuk pembentukan ikatan kovalen antara DNA dan membran. Hal ini sesuai yang dinyatakan Read & Mann (1985) untuk pengikatan yang kuat antara membran DNA dapat dilakukan dengan radiasi UV. Dalam proses hibridisasi digunakan beberapa komponen untuk buffer hibridisasi seperti SSC, Formamid dan SDS. SSC dapat berfungsi untuk meningkatkan efisiensi transfer yang besar, formamid berfungsi untuk menurunkan suhu hibridisasi sedangkan SDS berfungsi untuk mencuci ikatan yang tidak spesifik.



Gambar 4. Pengayaan kandidat-kandidat fragmen DNA bermotif mikrosatelit

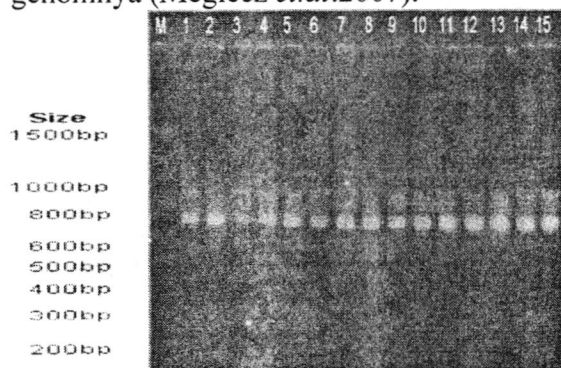




Gambar 5. Pengayaan kandidat-kandidat fragmen DNA bermotif mikrosatelit

Ket : 610 bp dan 450 bp.

Gambar 3, 4 dan 5 memperlihatkan bahwa diperkirakan adanya kandidat-kandidat fragmen DNA yang mengandung mikrosatelit, hal ini dinyatakan oleh Zane *et.al* (2002) bahwa metode Enrichment (pengayaan) adalah strategi yang baik untuk meningkatkan hasil dan mendapatkan target yang spesifik dalam mengisolasi penanda mikrosatelit, juga dinyatakan penggunaan waktu yang lebih efisien jika dibandingkan dengan menggunakan metode konvensional. Metode konvensional kurang efisien apalagi untuk spesies yang mempunyai frekuensi mikrosatelit rendah. Nyamuk *Aedes aegypti* ditandai dengan kelimpahan mikrosatelit yang rendah dalam genomnya (Meglecz *et.al.*2007).



Gambar 6. Pengayaan kandidat-kandidat fragmen DNA bermotif mikrosatelit

Ket : fragmen 700 bp, 550 bp dan 490 bp.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil ini dapat diambil kesimpulan :

1. Proses restriksi secara simultan dengan 3 macam enzim (Alu I, RsaI dan Hind II) dan ligasi dengan adaptor MluI untuk genom *Aedes aegypti* telah berhasil didapatkan.
2. Proses Hibridisasi dengan membran yang bermotif 5 macam motif (CT,AG, GT, AT dan AC) dengan pengayaan ini didapatkan fragmen DNA 700 bp, 610 bp, 550 bp, 490 bp dan 450 bp yang diduga mengandung motif mikrosatelit.

Saran

Penelitian ini harus dilanjutkan dengan proses kloning untuk mendapat motif motif mikrosatelit dan setelah dilakukan sekuensing akan dilakukan perancangan primer DNA mikrosatelit berdasarkan motif dan akan dilakukan uji generalisasi pada nyamuk *Aedes aegypti* vektor DBD di Sumatera Barat sehingga akan menghasilkan suatu Marker atau Penanda Molekuler DNA mikrosatelit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada HPEQ PROJECT/PROGRAM PENINGKATAN KUALITAS PENDIDIKAN DOKTER (PHKPKPD) FK UNAND Tahun Anggaran 2012 atas dukungan dana untuk melakukan penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Staf dan Analis Lab Biomedik FKUA dan Prof. Dr. sc. agr. Ir. Jamsari, MP sebagai konsultan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, E. 1998. Tingkat Keanekaragaman Genetik nyamuk *Aedes aegypti* dari Kotamadya Bandung Dengan Menggunakan Metoda Random



Hasmiwati: Characterization of vector DNA microsatellite Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) Aedes aegypti with Enrichment Method

- Amplified Polymorphic DNA RAPD} PCR. Tesis S2 Institut Teknologi Bandung.
- Craig J., Fowler S., Burgoyne L.A., Scott A.C., and Harding H.W.J. 1988 Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and Human Genom variation ; A concise review relevant to forensic biology. J. Forensic. Sci. 33:1111-1126
- Edwards, K. J, Baker J. H. A, Dally A. Jones C. And Karp A. 1996. Microsatellite Libraries Enchired for Several Microsatellite Sequences in Plant. Bio Tecques 20.
- Hoelzel, A.R. 1994. *Molecular Genetic Analysis of Population. A Pratical Aproach*, IRL. Press. Oxford University Press:71-74.
- Huber K, Mousson L, Rodhain F, Failloux A-B. 1999. Microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, 61:1001-1003.
- Huber, K., Mousson, L., Rodhain, F., Failloux, A.B., 2001. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti* the vector of dengue viruses. *Mol. Ecol. Notes* 1, 219–222.-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67:657-662.
- Jarne, P. And Pierre J.L. Lagoda. 1996. Microsatellites from molcul to populations and back. *Elsivier Sci.11* : 424-429.
- Kusumawaty, D. 1999. Isolasi dan Karakterisasi Mikrosatelit pada Jati (*Tectona grandis*). Tesis Magister Jurusan Biologi Moleculer . ITB Bandung.
- Kusumawaty, D., M.M. Margrita, N.R. Arma dan A. Pancoro. 2005a. Isolation and Characterization Microsattelites Locus in Oshronemus gouramy. Inteernational Procceding Seminars; Asian Science and Technology Week (7th ASWT): Biotechnology for Suistainable Utilization of Biological Resources in Agriculture and Healt ASEAN.
- Lovin, D.D., Washington, K.O., deBruyn, B., Hemme, R.R., Mori, A., Epstein, S.R., Harker, B.W., Streit, T.G., Severson, D.W., 2009. Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. *BMC Genomics* 10, 590.
- Paupy Christophe C., Brengues C. Ndiath C, Toty C., Herve JP, Simard F. 2010. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* and in Niakhar, Senegal *Genetics and Evolution* 10 (2010) 473–480.
- Promega. 1999. Protocol and Application Guide. Edisi ke 3 USA. Promega Corperation.
- Silva, F., Gusmao, L. and Amorim A. 1999. Segregation analysis of tetra and pentanucleotide short tandem repeat polymorphism : deviation from Mendelian expectation. *Electrophoresis*, 20 : 1697-1701.
- Slotman, M.A., N.B. Kelly, L.C. Harrington, S. Kittahawe, J. W. Jones, T. W. Scott, A. Caccone and J.R. Powell. 2007. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. *Molecular Ecology Notes*. 7 : 168–171.
- Steffen, P., Eggen, A., Dietz, A.B., Womack, J.E., Stanzinger, G. And fries, R. 1993. Issolation and mapping polymorphic microsatellites in catle. *Anim. Genet*.



- Sambrook, J., Fritschy, EF. And Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Zane L, Bargelloni L, and Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.



